

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法
及びトリプトファンの製造法

⑮ 特 願 昭61-87600

⑯ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑰ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑰ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6
⑰ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレー
ター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロ
モーター領域、m-RNA の合成をコントロールする
アテニューエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ
ームとm-RNA との結合領域、リーダーペプチドを
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群
をコードする領域及び最後にm-RNA の合成を停止
させるシグナルを形成するターミネーター領域が
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCGCGTTGTG GGCATTGCTG TCCCTGAGGT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTGTG GCTGGCCCGT TGTGGGTGCT CTCGGCAGTT
 GGGCCAACAC CCGTAAGCAC AGGGAATCCA CGCATTIAGG GTTCTTAACA CCGTATACCG CGTGGCACAG CGACCGGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCAA
 TCCTTTGTTA TTCCCTCGCT AGTTCCGTTT GTGGCCTTCT GGTTCGATGT GGCTGGTCTG GGCATTGGGT GTTGTGCGTG GCATCGTCTT CATTGGCATG
 AGGAAACAAT AACGGAGCGA TCAACGCAAA CACCGGAAGA CCAACCTACA CCGACCAGCA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC
 GGTCCGGGTA TGGCTCGGCA TACTGTTGCG ATGGTTGATG CGAACCGAGT CCGGAACCCG CGCAGGCGCC TGTTCGCTT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG
 CCACGCCCAT ACCGACGCGT ATGACAACGC TACCAACTAC GCTTCGCTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACMAAGGCGA CTTAACTTC TCCTCGGGCC
 TGGTGTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAAGACTCCG CTGAATGCCG CCAAGATTGA CTTCGATGCA GTGCGTAGAG CTGCGGAAAC TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGCG GACTTACGGG GGTTCCTAAT GAACCTACGT CACGCATCTC GACGCCITTG ATGTGTTCTT
 CCAAAAATG ATTAATAATT GAGACAAGCT TCCCACTATG TGATAAAGTC CCATTTTCTG AATAACTCTT GTCTCAGTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGGC
 GCGTTTTAC TAATTATTAA CTCGTTCGA AGGTGTATAC ACTATTTACG GGTAAACAC TTATTGAGAA CAGAGTCACT TTCGTGGGTG ACCACCACCG
 GCGCTAACTA AGCGAGCGTG ACACCTCAAG TTGTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGGC TCGTACTTCG TTCGACGAAG AAGCGGGCTT TTTGTGGTTT
 CCGGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGGAGTTC AACAAAAGTG AAACCTACTTA AAAAAATTCG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTCGCCCGGA AAACACCAAA
 TTAGCCCACTA ACCGCAAGC CCGGATCGA ATCAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT
 AATCGGCTGT TGGCGGTTG GAGCTAGCT TACTTCGAGC GTGCTCAT TATAAATAC AAAGGGTCTT TCCGAAGTCG GGTGTACT AAAGGAGCCA
 AGGTGCCCCA TGAGCAGGAA TCCCATGTT TTCTCCCTAG ATGTCCGCTA TCACGAGCAT GCTTCTCGCT TGTTCGCCA CTGGGTGGC ACAACCGCAG
 TCCACGGGGT ACTGCTGCTT AGGGGTACAA AAGAGGGATC TACAGCGAT AGTGTCTTA CGAAGACGCA ACAACCGGT GAACCCACCG TGTGGCGCTC
 ATGATGCGAG CCGTGTGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CGGTGTGAA GAGTTCGGTG CGCATTACGT GCACGGGCAA
 TACTACCTCG GGACAACCTT TCGGCACTAT AGTGGTGGT CTTACCATAA AGAAGGGAGC GCCACAACCT CTCAGCCAC GCGTAATGCA CGRPCCCGTT

CACGGTGGTA AGCGAGCCGC TGACGGACTC GGGTAGGGCA GTGGTGGCG GCCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC
 GTGCCACCAT TCGCTCGGGC ACTGCTGAG CCCATCCCGT CACCAACCGG CCGATTGTGT CGTCAACCG GTCATGTGT GGGCTCTCTT GTGGAAATCG
 TTCCCGCGCT CCGATCGGT TGATGAGCGC GAGCGCTCA CCGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGGCA AGTTGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGCGAGC
 AAGGGCGGGA GGCTACGCCA ACTACTCGCG CTGCGGAGT GCGCTGCTTC GTGGTAGCTT CAGCAGCGCT TCAACCTCAA GCTCAGCGCG ATGTGCTGCG
 CGTCCCTGCC ACTGCTCATG GGGGGTTTC CTTTGTATT CTTAGAAGCC TTTGAAAGCC TCCCGCGAGT CGAGGAAGC GTCAACACTT ACCCGGATTA
 GCAGGGACGG TGACGAGTAC CGCCAAAGC GGAACCTAAA GAATCTTTG AAACCTTTCG AGGGCGCTCA GCTCCTTTCG CAGTGTGTA TGGGCTAAT
 CCAGTTCGTC CTCGCGGAAA TCGTCTGGA CATCAATCAG CAGGACCGA CCGCCAAACT CACCGGCGTC TCCAACGCC CAGGCGAGCT CGAGGCGGAG
 GGTCAAGCAG GAGCGCCTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCCTGCTCT GGGGTTTGA GTGGCCGAG AGGTTGCGGG GTCCGCTCGA CTTCCGGCTC
 CTCAACAAGC TTTCAATTGT TATCGACGCC GCGCTCCCG CAACCGAACA GCGCTACCA ACCACCGCTC ACCAGGGCGA CACTCTTCG GTTGTGGCTG
 GAGTTGTTG AAGGTAAAG ATAGCTGCG GGGAGGGGG GTTGGCTGT GCGGATGCTT TGGTGGGAG TGCTGCCGT GTGAGAAAGC CAACACCGAC
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGT GAAAGAAAAC ATTTACAAGC GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGCGCGGCA CTTTCAACCGC
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG GCGTGAATCT AGTTACTCGA CTTCCTTTTG TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTTCACAG GCGCGCGCTT GAAAGTGGCG
 ACCATGTCCT GATGCATTTC CTGCTTATCT GCAGCTGCGT GCCACCAACC CGTGGCGGTA CATGTTCTAT ATCCGTGGAC TCAACGAAGG TCGCTGCTAT
 TGGTACAGGA CTACGTAAGC GACGAATAGA CGTCCACCCA CCGTGGTTGG GCAGCGGCAT GTACAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA
 GAACTTTTTG GCGCATCCCC TGAGTCCAAC CTCAGTTCA CCGCTGCTAA CCGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCCGCGCG CCGTGGACTCA
 CTTGAAAAAC CGGCTAGGGG ACTCAGGTTG GAGTTCAAGT GGGACGAGT GGCAGCTGAC GTGACATGG GTTAGGCTCC ATGGCGGGGG GCACCTGACT
 ACCCAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGAGTTGGAT ATGCGCACTG ATGCCAAGA GATCGCGGAC GACACCATCG TGTGCTATCT
 TGGTCTACCG GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGCGGTT ACTCAACCTA TACGCGTGAC TACGGTTTCT CTAGCGCGCTG CTGTGGTACG AACAGCTAGA
 CGCCCGGAAC GACCTCGGCC GCGTCTCGT CCCAGCGTGC CGCCGGGTTG CGGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC GCGTGTATGCA CTTGGTGTCC
 GCGGCGGTTG CTGAGCGGGG CGCAGAGCCA GGTTCGACG CCGCGCCAAC GCTAGAAAA CGTCCACCTA GCGATAAGGG CGCACTACGT GAACACAGG

特開昭62-244382 (3)

CGTGTGACGG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG AGCCCTATCG GCGCTGCATG AATATGGGCA CATTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGGCGTA
GCACACTGCC GCTGCANCTT GGGTCTCGAA CTACGAAACC TCGGATAGG CCGCACGTAC TTATACCCGT CCAACTGGCC GCGAGGCTTC AACGCGCGAT

TGGAGCTGTT GCGCGGCGTC GAAAAGCGCA GCGGTGGTTC TTATGGTGGG GCAGTGGGGT ACCTGCGCGG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT
ACCTCGACAA CCGCGCGGAG CTTTTCGGGT CCGCACCAAG AATACCACCC CGTCAACCCA TGGACGCGCC GTTACCCTTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TGCTTCGGCG TTTGTCCAGG ATGGTCTGGC TGCTGTGCAG GCTGTGCTG CTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGCGCATGA GACGTTGCAC
AGCAAGCGCG AAACAGGTCC TACCACACCG ACGACAGCTC CGACCACGAC CACACCAGGC GCTAAGATTA CGAGTTAGAC TTGGGCTACT CTGCAACGTC

AAGCGCTATG CCGTGTGAA TGCCATTGCG CTGTGCTGCT GTTCCACTTT GGAGGTCATC CGATGACACA CGTTGTCTC ATTGATAATC ACGATTCTTT
TTCCGCATAC GGCACAACCT ACGGTAAACC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAACATATTAG TGCTAAGAAA

TGCTTACAA CTTGTGGATG CTTTCGCGGT GCGCGGTTAT AAGTGCACGG TGTTCGCGAA TACGCTGCCA GTTGAAACCA TTTTGGCAGC CAACCCGCGC
ACAGATGTT GACCACTTAC GCAAGCGGCA CCGGCCAATA TTCAGGTGCC ACAAGGCGTT ATGCCACGGT CAACCTTGGT AAAACCGCTC GTTGGGCGCTG

CTGATCTGCC TTTCACTGCG ACCTGGTTAC CTTGCGGATG CCGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGCGCA CACTCGGCCA GATTCTTTA CTGGCTATT
GACTAGCGG AAGTGGAC TGGACCAATG GACGGCTAC CCGGTTGTA CTACCGGAC TAGCTCGCT GTGAGCGCGT CTAGGAAAT GACCCATAAA

GCGTCGGCTA CGAGGCATC ATCGAATACC ACGGCGGCAA GGTGAGCCT TGTGCGCTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCTTA CTGATGCAGC
CGGAGCGCAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TCGCGCGCTT CCAACTCGGA ACACCGGAC ACGTGGCGTG GTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTC

TGTGCAGAGC CTTGTTTTG CAGGTCTTGC CACTGATGTT GAGCCTGATC ATCCAGAAAT CCCAGGCGCG AAGGTTCCAA TTGCGCGTTA TCACTCACTG
ACAGCTCTCG GGACAAAAC GTCCAGAACG GTCCTACAA CTCGACTAG TAGGCTTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCGGCAAT AGTGAGTGAC

GGCTGCGTGG TTGCCCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGGCA CTTGTTCTC TGAGATTGGT GATGTCATCA TGGCGGCGAG CACCAACGAT GGAAGGCCA
CCGACGACCC AACGGGGTCT GCCATAACTT AGTAACCGT GGACAAGGAG ACTTAACCA CTACAGTAGT ACGCGCGTG GTGGTGCTA CTTTCCGGT

TGTGCGTGA GTTACCCCT GAGTCAGTG TGAGCCCAAC GGTCTCTATC ATTTGTCTCC GCTGTGTCGA ACAACTTCTC GCGAACTAAT AAAAGGATT
AACCGGCGT CAAGTGGGA CTCAGTCAGC ACTCGGCTG CCCAGGATAG TAAACAGGG CGACACAGCT TGTTCAGAG CGCTTGATTA TTTTCTTA

TGATTCTGA CTTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAAGC CTTACTTGGG TAACCCCACT CCAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTG ACCCCGCTGA
ACTAAGTACT CAAGAGTTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTGC GGTGAACCT ATTGGGGTGA GCTTGGGACC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGGCGACT

CCGTGGGTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CGTACTCGCG GTGAGCAGTT CGCTGATATT CCGCGCGCTG CCAAGGCATT
GGACCCACT TATGCTACTG CAGCTGTAGC GTGCGACGA ACCTGTGTAG CGATGAGCGC CACTCGTCA GCGACTATAA CCGCGCGGAC GGTTCGGTAA

CCTCGCGCGG GCTCGTCCGT TCCCGATTAC TGGCGCAGGT TTGTAGATT CCGCTGCGAC TGGTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCAACGGC
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA AGGGCTAATG ACCGCTCCA AACGATCTAA GCGGACCGTG ACCACCGCTG CCACGGTGT GTAGTTCTA GTGTGCGCG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CGGTGGAGTG AAGCTGGCTA AGCACGGCAA CCGTTCAAGT AGCTCCAAGT CCGGTTCCCG CGATGTGCTG GAGGCGCTGA
CGAAGGACT AGCTGCTAG GCCACCTCAC TTGACCGAT TCGTGGCGTT GCGAAGTCAC TCGAGGTTCA GCGCAAGCGG GCTACACGAC ATCCGCGACT

ATATTCTTTT GCGCCTTGAT GTGGATCGTG CTGTGAAGTG GTTGAAGCG TCCAACCTCA CTTTCTGTT CACACCTGCG TACAACCTG CGATTGCGCA
TATAAGGAAA CCGGGAATA CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCG AGGTTGAAGT GGAAGGACAA GTGTGAGCG ATGTTGGGAC GCTAACCGT

TGTGCAGCGG GTTCCGCAAG CGCTGAAAT CCCACCATC TTCAACACCG TTGACCAAT CTTGTCCCG GCGGCGCGCG AGCGTCAGAT CATGGGCGTG
ACAGTCCGG CAAGCGGTCC GCGACTTTAA GCGGTGCTAG AAGTTGTGCG AACCTGGTAA CGACAGGCGG CCGCGCGCGG TCGAGTCTA GTACCCGAC

GCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCC GAGCTCTTC CCGAGCTGG CCGTACACCG GCGCTTCTG TCGATGGCG AGGCACCGAT GAGATCGCAG
CGGTACCGT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCAGAAAG CCGTCGACCC GGCATGTGCG CCGGAACAAC ACGTACCGCG TCGGTGGCTA CTCTACCGTC

TCCACGGCAC CACCTTGGTG TGGCAGCTTA AAGAAGACCG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCGCTGA GGACCTTGGC CTTGGCGCGT ACACCTTGA
AGGTGCGCTG GTGAACCA ACCCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGCTAGCTC GTAATGTGCT AGCTCGGACT CTTGGAACCG GAACCGCGCA TGTGGAACT

CGATCTCGTG GTTGGCGCTG GCACTGAGAA CCGGAAAGCT ATCGCGGCTA CTTTCCGCGG CACCGCGCCT GATGACACCG GTGATCGCTT GCGTGGCTCC
CCTAGAGCAC CCACCGGAGC CTTGACTCTT CCGGCTTCCA TACGCGCGAT GAAAGCGCGC GTGGCGGGA CTACGTGTG CACTACGCA CCACGCGAG

GCAGGTGCGA TGTCTATCT CAACGCGGAT GTCGACTCT TGAAGGATG TGCACAAAAG CCGCTTCTCT TGTGTGCGCA CCGGACGAC CAGGATGCT
CGTCCAGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTGTTT CCGGAAAGGA ACGAACGCT CCGCTGCTG GTCCGTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGGCCAAAGCA CGAAGAGATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCCCACGG TGTGGAAAG CATCGTGGAG GGTGCTGGC
 ACCGGTTCTG CTCTCTCTAG CTAATGAGTC TTTTCCTCAG AAGCTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGGGC

 GACACCTGGA GGAATTCGC GCTGGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGCG CTTCACAAAT CCACCCGCTC TCTGTTGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGGG
 CTGTGCACCT CCTTAAGCG CGAGCGTAGC GAGTGCACCT ACACCTACGC GAAGGTTTTA GGTGGGGCAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC

 AGGGGCGCGT TTCATCATGG AGTGCAGTC CGCATCGCCT TCTTTGGGAA TGATTCTGTA GCACTACCAAG CCGGGTGAAA TCGCTCGCGT GTACTCTGCG
 TCCCGCGCCA AAGTAGTACC TCAGGTTTCA GCGTAGCGGA AGAAACCCCT ACTAAGCACT CGTGATGGTC GGGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG

 TACGCAGCGG CAATTTCCGT GCTGTCCGAG CCGGATCGTT TTGGTGGCGA TTACGATCAC CTCGCTACCG TTGGCGGTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT
 ATGCGTCCCG GTTAAAGGCA CGACACGCTC GGCCTAGCAA AACCAACCGT AATGCTAGTG GAGCGATGGC AACCGCGATG GAGAGTAGAA GCGCACGACA

 GCAAGAGCTT CATCATGAT CCTGTCCAGG TACGACCGGC GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA
 CGTTTCTGAA GTAGTAACCT GACAGGGTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACGACTAC GGTAGGACGA GTAGGAGAGA CACGAACCTAC TACTTCTCAT

 CGACCCACTC GCTGGCGAGG CTGCGCGTTT TGATCTGGAT ATCCTCACCG AGGTATTGTA TGAGGAGGAA CTCGCGCGCG CCATCAAGCT GGTGCGGAAG
 GCTGCGTGAG CGACGGCTCC GACGCGCAAA ACTAGACCTA TAGGAGTGCG TCCAATAACT ACTCTCTCTT CAGCGGGCGG GGTAGTTGGA CCGACGCTTC

 ATCTTTGGCG TCAACCAACG CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGA TCGTTACAGT CGCCTGTCCA AGCTCATTCC AGCAGATGCC GTGCTGCTGT
 TAGAAACCGG AGTTGCTGGC GTTGGACGTA CTAGACAGGT AACTAAACCT AGCAAGTGCA CGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACCG CACGAGCACA

 CTGAGTCTGG CGTGCGCGAT ACCGAAACCG TCGCGCAGCT AGGTGGGCAC TCGAATGCAT TCCTCGTTGG CTCGCGAGTG ACCAGCCAGG AAAACGTGGA
 GACTCAGACC GCACCGCGTA TGGCTTTGGC AGCGGTCGA TCCACCGCTG AGGTACGTA AGGAGCAACC GAGGCTGAC TGGTGGTCC TTTTGACGT

 TGTGGCAGCG CGCGAATTGG TCTACGGCGG CAACAAAGTC TCGGAGCTCA CCTACCAAG TGCAGCACA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGG GGTCTACGGC
 AGACCGTCCG CGCGTTAACC AGATGCCGGG GTTGTTCAG ACGCTGAGT GGAGTGGTTC ACCTCGTCTT TGGCGAGCGG GTGCGCCACG CCAATGCCG

 GGGCTCATCT TCGAAGAGCG ATCGCCACGT AATGTTTCACT GTCAAAATC GCAAAAAATC ATCGCGCGAG AGCCCAACCT GCGCTACGTC GCGGTACGCC
 CCGGAGTAGA AGCTTCTCGG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CTTTTTTAG TAGCGCGCTC TCGGTGGA GCGGATGCAG GCGCAGTCCG

GTCCGACCTC CGGCTACAAG GATTGCTTG TCGACGGCAT CTTCGCGTA CAAATCCAG CCCCAGTGA GGGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCATTGAT
 CAGCGTGGAG GCGCATGTTT CTAACGAAAC AGCTGCCGTA GAAGCGGCAT GTTTAGGTGC GGGGTGACGT CCGCTCGCAG CTTCGCTCTT TCGGTAACCTA

 CGCGCGCGTT CGTGAAGAGG TTGGACCGCA GGTCCAGGTC TGGCGCGCGA TCTCGATGTC CAGCCCTTGG GGGGCTGAAG TGGCAGAGGG TGACGTCCAT
 GCGCGCGCAA GCATTTCTCC AACCTGGCGT CCAGGTCCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG CTCGCGGAAC CCGCGACTTC ACCGTCTCCG ACTGCAGCTA

 AAGCTAATTC TTGATGCCCA TGAAGGTGGC AGCGGGGAAG TATTGCACTG GGCTACGGTG CCGCGCGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC GCGGGAGGCA
 TTGATTAAG AACTACGGGT ACTTCCACCG TCGCGCCTTC ATAAGCTGAC CGGATGCCAG GCGCGCGGAC ACTTCCGTTT CAGAAACGAG CCGCCTCCGT

 TCTCTCCGGA CAACGCTGGC CAGGCACTCG CTGTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGCGCTGGA ATACCCCGCC GGTGCAAGGA CGTGGGGCTG
 AGAGAGGCGT GTTCCGAGCG GTCCGTGAGC GACACCGGAC GCGTCCAAAT CTGTACTTGA GACCGCACCT TATGGGGCGG CCACGTCCGT GCACCCCGAC

 GCGCGAAAGA TCGCGGGCGG CTGCTGAAA TTTTCCGCGC CATCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAA GAAACTTGG
 CCGCGTTCT ACAGCGCGCG GACGACTTTT AAAAGCGCTC GTAGAGGTGT AAGGTAATGA TTTCCAAAT TATCCTAGTA CTGACTTTT CTTTGAACC

 GCGGCTCCAC GCTGCTACCT GCATACTTCG GTGAATTCGG CCGCCAGTTC GTGCGGAAT CCTCTCTGCC TGCTCTCGAC CAGCTGGAGA AGGCTTCTGT
 CCGCGAGCTG CGACGATGGA CGTATGAAG CACTTAAGCC GCGGCTCAG CAGCGCCTTA GGGAGGACGG ACAGAGCTG GTGACCTCT TCGGCAAGCA

 TGACGCGACC AACAGCCAG AGTTCCGCGA AGAAGTCGGC GGCTACCTCC CGGATTATCT GGGCGGCGCA ACCCGGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA
 ACTGCGCTCG TTCTCGGCTC TCAAGCGCTC TCTGACCGC CCGATGCGAG CGCTAATAGA GCGCGCGGCT TGGGCGCACT GGTATTACGAG GTTGGAGCGT

 CTGCGAGCGG AAGCCAAAGG CTTTGGCGGG ATCTTCTCTA AGCGCGAAGA CCTCGTCCAC GCGGCTGCAC ACAAACCTAA CCAGGTGATC GCGCAGGTGC
 GAGCGTCCGC TTCCGTTTCC GAAACGCGCC TAGAAGGAGT TCGCGCTCTT GGAGCAGGTG CCGCCACGTC TGTTTTGATT GGTCCACTAG CCGGTCCAGC

 TGCTTGCCAA GCGCATGGCG AAAACCCGCA TCATCGCAGA CACCGCGCGA GCGCAGCAGC GCACCGCCAC GGTCTCTGCA TGTGCGCTCA TGGGCTCGA
 ACGAAGCGTT GCGGTACCGG TTTTGGGCGT AGTAGCGTCT CTGCGCGCGT CCGGTCTGTC CGTGGCGGTC GCGAGAGCGT ACACGCGAGT ACCCGGAGCT

 GTGCGTTGTC TACATGGCG CCAAGGACGT TCGCGCGCAG CAGCGCAAGC TCTACCGCAT GCAGCTGCAC GCGCGGAAG TCATCCCGT GGAATCTGCT
 CACGCAACAG ATGTACCGCG GGTTCCTGCA ACGGGCGGTC CTCGGGTGCG AGATGGCGTA CGTGGAGCTG CCGCGCTTCC AGTAGGGGA CTTAGAGCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCACCC TGAAGGACCC GGTGAATGAA CGGCTGCCGC ATTGGACCCG AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCC GCGCCGCAAC
 AGGCCGTCGG ACTTCTCGG GCACCTTACTT CGCGACGCGC TAACCTTCCG TTGCAAGCTG CTCAGGGTGA TGGAGAGCC GTGGGCGCGG CCGGGCGTGG

 CATTCCCAAC CATCGTCCGT GAATTCACCA AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCG CACCGGCAAG CTTCGCCAGG TTGTGGTCCG
 GTAAGGCTTG GTAGCACGCA CTAAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCGTGTCT ACGATCTCGG GTGGCCGTTG GAAGGCTTGC AACACCAGCG

 CTGTGTCCGT GGTGGCTCCA ACGCCATCCG CATGTTCCGA CACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTCCGGCGTG AGCCAGCCGG TGAAGGCTC
 GACACAGCCA CCACCGAGGT TCGGTAGCG GTACAAGCGT CTCGAAGTAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGCGAC TCGGTCCGGC ACTTCCGGAG

 GACTCCGGCA AGCAGGCGC AACCATCACC AAGGTCAGA TCGGCATCCT GCACGGCACC CGTTCCTACC TGATGCCCAA CTCGACGGG CAAGTGGAA
 CTGAGGCGGT TCGTCCGGG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT AGCGTAGGA CGTCCGCTGG GCAAGGATGG ACTACGCGT GAGGCTGCCG GTTACCTTC

 AGTCTACTC CATCTCCGGC GGACTTGATT ACCCAGCGGT CGGCCACAGC ACCCACCCT GCACGCCACC GCGCGCACT ACGTTGGTAT CACCGACCGC
 TCAGGATGAG GTAGAGCGCG CCGAAGTAA TGGGTCCGCA GCGGTCTCG TGCGTGTGA CGTCCGCTGG CCGCGCGTGA TGCAACCATATA GTGGCTCGCG

 GAAGCCCTCC AAGCATTCCA GTAGCTCCG CCGCTACGAA GGCATCATCC CGCGCACTGG AATCCTCACA CGGTTCCGC TACGACTCAA GCGGCCAAG
 CTTCGGCAGG TTGCTAAGGT CATCGGAGCG GCGCATGCTT CGTAGTAGG GCGCGTGACC TTAGGAGTGT CGGCAAGCGG ATGCTGAGTT CCGCGCGTCC

 ACCGCGGAAG AGGAAGGCCA GAACCTAAC ATCCTCGTCT CCCTATCCGG CCGTGGCGAC AAGGACGTTG ACCATCCGGC CGGCACCCCTC GAAGAAATC
 TGGCGGCTTC TCGTCCGGT CTGAATTGG TAGGAGCAGC GGCATAGGCC GGCACCGCTC TTCTGCAAC TCGTAGCGCG GCGGTGGCAG CTCTTTTTAG

 CAGAACTGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CCGTTACGAC GATCTTTTTG GCGACGCTC GACAGGGTCA GGGGAGGGCG CCTTTGTTCC TTTCATCATG
 GTCTTGACTA GGACTTCCCT TTGGCTACTC GGCAATGCTG CTAGAAAAAC CGTGGCGAG CTGTCCAGT CCGTCCCGC GGAACAAGG GAAGTAGTAC

 CTGAGCGACC CTTCACCAGA GGAGGCTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAACGTGGC GCAGATGCAC TGGAACTTGG CGTACCTTTC TCGGACCCAG
 GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CCGCGAAG GTCTAGTAGA GGTGTCTTGA GCTTGACCG CGTCTACGTG ACCTTGAAAC GCATGGAAAG AGGTGGGTCT

 TTGCCGATGG CCGCACCGTC GCGGAATCC ACCTCCGGC ACTCGAGCG GCGGCCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGCAGC
 AACGGCTACC GCGGTGCGAG CGCCTTAGG TGGAGGCGCG TGAGCTCGCG CCGCGGTGGC ATCTGTCCGG TGAGCTCGTC TAGTTCGGCG ACGCGGCTCG

CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTTCA CCGTGGGCTT GGATCGCTTC TACCAAGAGT TCGCTGAAGC TGGCGCAGAC
 GATCGGCTTC CAAGGGTAGC CTACGAGTA GATGCCGTTG CAAGGAAGT GGCACCGAA CCTAGCGAAG ATGGTTCTCA AGCGACTTCC ACCGCTCTCG

 TCCATCTCC TCCAGACGT CCCAGTCCG GAAGGCGCAC CGTTTTCTGC AGCAGCCGGA GTTCATCCA TTACATCGC TCCGGCCAAC GCGAGCGAGA
 AGGTAGGAG AGGTCTGCA GGTGAGGG CTTCGGCTG GCAAGAGCG TCGTGGGCT TAAGTAGGT AAATGTAGCG AGGCGGTTG CGGTGCTCT

 AAACCTTCA GGTGTCTCC GCGCATCAA AGGGTACAT CTACGCCATC TCCGCGAGC GGTCTACCG CACCGAAGT GAATCATCCA CCGAGGCGCT
 TTTGGAGCT CCCACAGAG GCGGTAGT TCCGATGTA GATGCGGTAG AGGGCGGTG CCGAGTGGC GTGGCTTGA CTAGTCCGT GGTGCGCGA

 GTCCGAGTG GTGACAACA TCAAGAAAT TGATGGCGCA CCCATCCTCT TGGGCTTCGG CGTCTCATCC CCTCAGCAG TGGCAGAGC GATTGCAGCG
 CAGGCGTCA CACCTGTTGT AGTTCTTAA ACTACCGGT GGTAGGAGA ACCCGAAGC CTGAGTAGG GGAGTCTGC ACCGTCTCG CTAACTGCG

 GGTGCTTCC GTCCGATCAC GGTTCGGC ATCACCAGA TCATTGCTTC CCACTGGGA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA GATATGGAGC
 CCACGAAGC CAGGCTAGT CCAAGGCGC TAGTGGTCT AGTAAGGAAG GGTGACGCTT CCACTCGTG GCTTGGGAG GTGGTAAGCT CTATACCTGC

 GTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTCATCT CTGCGACTGA AGGCAGCGAC CAAGAAGGT TAGCCCTTTA AATGTGGCAA TGTTTCAGT GAAACATTCT
 CAACCTTCT CTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGCTGACT TCGGTCCGT GTTCTTCCAA ATCCGGAAT TTACACCGTT ACAAAGTGA CTTTGTAAGA

 GAGAGAATGT AGAAACATCA AAGAAGCCAC CTCCTAGCTC TCGGGCTGG AGCGCGCTTC TTGTTTTCCG GTTTAGGAAA TCTCAGGCTT TTGGAGATCT
 CTCTCTTACA TCTTTCTAGT TTCTTCCGT GAGGATCGAG AGCCCGACCC TCGCGGAG AAACAACGC CAATCTCTT AGAGTCCCA AACCTCTAGA

 TAGCTTCGAG CCGTGGGT AGGAGCGCC GCGGAGGAG CAATCTTAGG CTAGCTCCA GCGCCAGCG TTGGAGTGG ATCAGCTTC GCTTCCGA
 ATCCAAGCT GCGCACCCCA TCTCGCGG GCGCTCTCT GTTAGAATCC CATCCAGCT CCGGCTCGC AACCTCACG TAGTGAAGG CGGAAGAGGT

 CCGCGTACC GTTGGAGCT GATCC
 GCGCGATG CAACCTTCA CTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNA が人工的に合成されたDNA 又は微生物に由来するDNA である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレビバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNA が1部置換、変異又は削除されたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNA がプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNA を用いるL-トリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリアトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)

第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPHVFSL	DVRYHEDASA	LFAHLGGTTA	DDAALLLESAD	ITTKNGISSL	AVLKSSVRIT	CTGNIVVTQP	LTDSGRAVVA	RLTQQLGOYN	TAENTFSPPA
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDERERL	TAPSTIEVLK	KLQFESGYSD	ASLPLLNGGF	AFDFLETFET	LPAVEESVNT	YPDYQFVLAE	IVLDINHQQD	TAKLTGVSNA	PGELEAELHK
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAALP	ATEHAYQTP	HGDTLRVVA	DIPDAQFRTO	INELKENIYN	GDIYQVVPAR	TFTAPCPDAF	AAYLQLRATN	PSPYMFYIRG	LNEGRSYELF
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASIESNLKF	TAANRELQLY	PIAGTRPRCL	NPDGSINDEL	DIRNELDMRT	DAKEIADDTM	LVDLARNDLA	RVSVPASRRV	ADLLQVDNYS	RVNHLVSRVT
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLDPELDAL	DAYRACHNMG	TLTGAPKLRA	MELLRGVEKR	RRGSYGGAVG	YLRGNGDMNH	CIVIRSAFVQ	DGVAAVGAGA	GVVROSNPOS	EADETLHKAY
510	520								
AVLNAIALAA	GSTLEVIR								

第 3 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTSPVLI DNH DSFVYNLYDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAANPDLICL SPGPGYPADA GNMHALIERT LGQIPLLCIC LCYQALIEYH GCKVEPCGPV

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HGTTDNMILT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRKVPI GRVHSLGCVV APDGIESLCT CSSEIGDVIH AARTTDGKAJ GLQFHPESVL SPTGPILSR

210
CVEDLLAN*

```

第 4 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTSPATLXVL NAYLDNPTPT LECATIEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAG AAKAFIAAAR PFPITCAGLL DSAGTGGDGA NTINITTGAS

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIAASGGVKL AKHGCRSVSS KSGSADVLEA LNIPLGLDGD RAVKWFESHW FTFLFTPAYH PAIAHVQPVH QALXPPTIFN TLGPLLSPAR PERQIMGVAN

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ANHGOLIAEV FRELCRTRAL VVHGAGTDEI AVHGTTLVWE LKEDGTIEHY TIEPEDLGLG RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACCTGPA HRDALAASAG

310     320     330     340     350
AMPYLNQDGD SLKDGAKRAL SLLADATTOA WLAHHEEIDY SEXESSND*

```

第 5 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTSNWLPVTL ESIVEGRRGH LEEIRARIAH VDVDPALPKST RSLFDSLNGG RGGARFINEC KSASPSLCHI RENYQPGEIA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GDYDHLATVC ATSHLPVLCK DFIIIDPVQVR PARYFGADAI LLHLSVLDEE EYDALAAEAA RFOLDILTEV IDEBEVARAI KLGAKIFGVH HRNLHDLSD

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
LDRSRRLSKL IPADAVLYSE SGVRDTETVR QLGCHSNAPL VGSQLTSGEN VDLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQTARAA GAVYGGGLIFE EASPRNVSRE

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
TSQKIIAAEP NLRVYAVSRR TSCYKDLLVD GIFAVQIHAP LQGSVEAEKA LIAAVREEVG PQVQVHRAIS MSSPLCAEVA EGDVDKLIID ANEGGSCEVF

410     420     430     440     450     460     470     480
DHATVPAAYK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSG VEYPACAGTW GWCERCRRAA ENFRDHLHIP LLKV *

```


第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGG TLLPAYPGGF GGFVAESLL PALDQLEKAF VDATNSPEPR EELGGYL RDY LGRPTPLTEC SNLPLAGEGK GFARIFLKRE DLVHGGAHKT

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
NOVICOVLLA KRMGKTRIIA ETGAGQHCTA TALACALHCL ECVVYHGAKD VARQOPNVYR HOLHGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALRDWT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQMLE RTGKLPOVVV ACVGGGSNAI GNFADFIODE GVELVGAEPG GEGLDGCKNG ATITNGQIGI LNCSTRSYLNR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
MSDGVVEESY SISAGLDYPC VGNSTHTCTP PARTTLVSPT PKPSKHSSSL ARYEGIIPTI GILTRVRLRL KRAKTAEEEG QNLTIIVLSL GRGDKVDNR

410     420
AGTLEENPEL ILKDNR

```

第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSGPS PEEAFQIIST AIERGADALE LGVPPSPDVA DGPTVAESBL RALDGGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPIGM

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGNVPFTR GLDRPYDEFA EAGADSILLP DVPVREGAPP SAAAGIDPIY IAPANASEKT LECVSAASNG YIYAISSRGV TGTERESSTD GLSAVDNIK

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSPQHVA DAIAGASGA ITGSAITKII ASHCEGENPW PSTIRDMDGL KKDLTEFISA TEGSDQEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニューエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるL-トリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌(Coryneform bacteria)は、バーゼース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergeys Manual of Determinative Bacteriology)第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレビバクテリウム・サッカロリチウム

ATCC 14066

ブレビバクテリウム・インマリオフィウム

ATCC 14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム

ATCC 13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825

ブレビバクテリウム・フラバム ATCC 13826

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

ATCC 19240

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム

ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム

ATCC 13032, 13060

コリネバクテリウム・リリウム ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ATCC 17965

ミクロバクテリウム・アンモニアフィルム

ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニューエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域 (*trpL*)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

し(例えばH.Saito and K.Miura Biochem.Biophys. Acta 72,619(1963)の方法が使用できる。)、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離(クローン化)できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼーションにより、単離可能である。

ンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE.coli、B.subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- (1) pAM 330 特開昭58-67699参照
- (2) pAM 1519 特開昭58-77895参照
- (3) pAJ 655 特開昭58-192900 参照
- (4) pAJ 611 同 上
- (5) pAJ 1844 同 上
- (6) pCG 1 特開昭57-134500 参照
- (7) pCG 2 特開昭58-35197参照
- (8) pCG 4 特開昭57-183799 参照
- (9) pCG 11 同 上
- (10) pCC 1 特開 (Mautin/Ajico)

- (11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの断裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

法、またはパチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153(1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choan, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111(1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Frink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のパチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

プレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、プレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、プレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アザセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagino, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に依りアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含む澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、實質的にトリプトファン生産菌が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、ブレヴィバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インク

ーフエロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが繁用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異ならないように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼ β サブユニット遺伝子のクローニング

1-1 ブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225 (PERM-P4370) を1 μ lのCMG培地（ペプトン1g/dl、酵母エキス1g/dl、グルコース0.5g/dl、及びNaCl 0.5g/dlを含み、pH7.2に調整したもの）に接種し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5 μ gのDNAを得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子重5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するブレ
ビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037
を100 mlのCHG培地に接種し、30℃で対数
増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処
理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心
により上清を得た。フェノール処理ののち、2容
のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これ
を少量のTEN緩衝液(20mMトリス塩酸塩、20
mM NaCl、1mM EDTA (pH 8.0))に溶解後、塩
化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠
心によりプラスミド画分を分離し、最終的に
pAJ1844 プラスミドDNA 約200 μgを得た。

1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10 μgと1-2で得たプ
ラスミドDNA 5 μgとを制限エンドスクレアーゼ
Pst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断
した。65℃にて10分間加熱した後、両反応液を
混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、
T₄ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃
に24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5 Mシュクロース、20 mMマ
レイン酸、20 mM塩化マグネシウム、3.5 %ベナ
ッセイブロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)
0.5 mlで洗浄した。次いで10 mg/mlのリゾチ
ームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間ブ
ロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠
心分離後、プロトプラストをSMMPで洗浄し0.5
mlのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られ
たプロトプラストと1-3で調製したDNA 10 μg
を5 mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリ
コールを最終濃度が30%になる様に添加した後、
DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温
に2分間放置した。このプロトプラストをSMMP培
地1 mlで洗浄後、SMMP培地1 mlに再懸濁し、
形質発現のため、30℃で2時間培養した。この
培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地に塗
布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1 ml
あたりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
12 g、KCl 0.5 g、グルコース10 g、
MgCl₂・6H₂O 8.1 g、CaCl₂・2H₂O 2.2 g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2
倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱
を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリ ボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺 伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブ ユニット遺伝子のクローニング

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのア
ンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリ
ボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株№
38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠
損株№30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メ
チル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容
菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトラ
ンスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を
5 mlのCHG液体培地で対数増殖期の初期まで培
養し、ペニシリンGを0.6ユニット/ml添加後、
さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

ペプトン4 g、粉末酵母エキス4 g、カザミノ酸
(Difco社) 1 g、Na₂HPO₄ 0.2 g、コハク酸ナトリ
ウム13.5 g、寒天8 g及びクロラムフェニコ
ール3 μg/mlを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々
約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニー
が出現してきたのでこれを最少培地(2%グル
コース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1
%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシ
ウム7水塩、2 ppm鉄イオン、2 ppmマンガンイ
オン、200 μg/mlサイアミン塩酸塩、50 μg/ml
ビオチン、カザミノ酸(Difco) 3 g/l、クロラ
ムフェニコール10 μg/ml、pH 7.0、寒天
1.8%)にレプリカし、クロラムフェニコール耐
性でかつトリプトファン要求性の消失した株を
AS60を用いた区分から2株、№38を用いた区分
から1株、№30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、い
ずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844
よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2.

ブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング
ブレバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSalI、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside), IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含むし寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kb.のPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grunstein, M., Wells, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI 区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。その結果、ptrpE97はptrpE36、~~ptrpD3851~~、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及び~~ptrpD3851~~のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド p33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約 2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分画し SstI, Hind III で切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8, λ^-) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いは SstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coli の要求性を消失させた。

3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド p

列はブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要な RNA ポリメラーゼの結合部位 (trp プロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) に対応する DNA 配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと trpE 構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに関与するリーダーペプチド (trpL) をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約 2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHI で切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5644 (trpA33, rha-7, λ^-) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例 4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例 1 で得られた p19, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示す DNA 塩基配列が得られ、この塩基配

実施例 5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、p\kappakl75-6 (アンピシリン耐性 (Ap)、テトラサイクリン (Tc) 感受性) (Brosius, J., Gene 27, 151 (1984)) にサブクローニングした。得られた組換えプラスミド p

さらに、pAM330 由来のトリメトプリム耐性のベクター、pAJ226 の PstI 切断部位に PstI で切断した上記組換えプラスミド ptrp 存在下では Tc に対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると考えられる。

第1表 カザミノ酸を添加した最少増地におけるテトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	テトラサイクリン耐性度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		トリプトファン添加 ($1\text{ mg}/\text{ml}$)	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加	トリプトファン無添加	トリプトファン添加
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	25	25	5	5
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
クロラムフェニコール耐性度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
pEB003TR* in <i>E. coli</i>	400	400	200	200

*pEB003TRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミド pAJ234 を用いて、L-トリプトファン生産について検討した。

pAJ234 を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタム M247 を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られた AJ12195 (FERM-P8014) を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地 (グルコース 13.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g、フマル酸 1.2 g、酢酸 3 ml、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、d-ビオチン 50 μg 、サイアミン塩酸塩 200.0 μg 、メチオニン 40.0 mg、チロシン 65.0 mg、大豆蛋白加水分解液「味液」50 ml、 CaCO_3 5.0 g を水 1 l に含む、pH 6.5) 20 ml を 500 ml の坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中の L-トリ

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK756¹⁷⁵⁻⁶上にサブクローン化した (第5図)。その結果AluI-HindIII断片 (51bp) 及び HaeIII-HindIII (135bp) 上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモータープロベクター pKK232-8 (Ap耐性、クロラムフェニコール感受性) を用いて得ており、AluI-HindIII断片 (51bp) 上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例 6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたブレバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうち trpD, trpC, trpB, trpA の4遺伝子を有する組換えブラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042 を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のL-トリプトファン蓄積量

菌株	L-トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247 を得るためには寄託された AJ 12195 より宿主細胞を扱うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる (Bact. Rev., 36, p361-405 (1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195 を CMG 液体培地に接種し、37℃で一晩培養 (高温処理) 後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しない CMG 寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクロラム

フェニコール感受性株として分離される株が
M 247 である。

4. 図面の簡単な説明

第1図

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素
地図

第2図

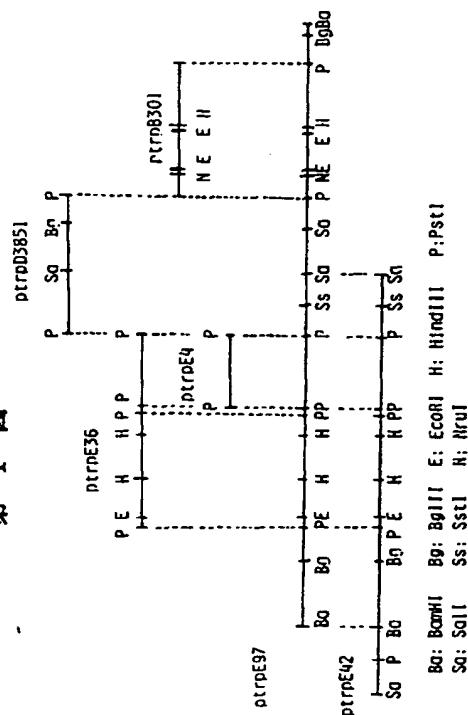
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため
の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18、
pUC19 或いはM13mp10 にクローン化し、矢印で
示した方向へ、dideoxy 法により塩基配列を決
定した

第3図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの制御領域
—ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
trpE構造遺伝子の5'上流領域の塩基配列並びに
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

第1図



RNA の2次構造—

第4図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第5図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の限定のための戦略

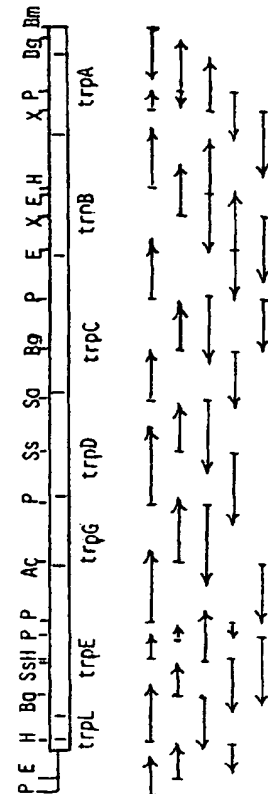
-35 及び-10 はE.coliのプロモーターコンセン
サス配列の-35、及び-10領域に相当する領域
を示す

第6図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンのターミネーターの構
造

特許出願人 味の素株式会社

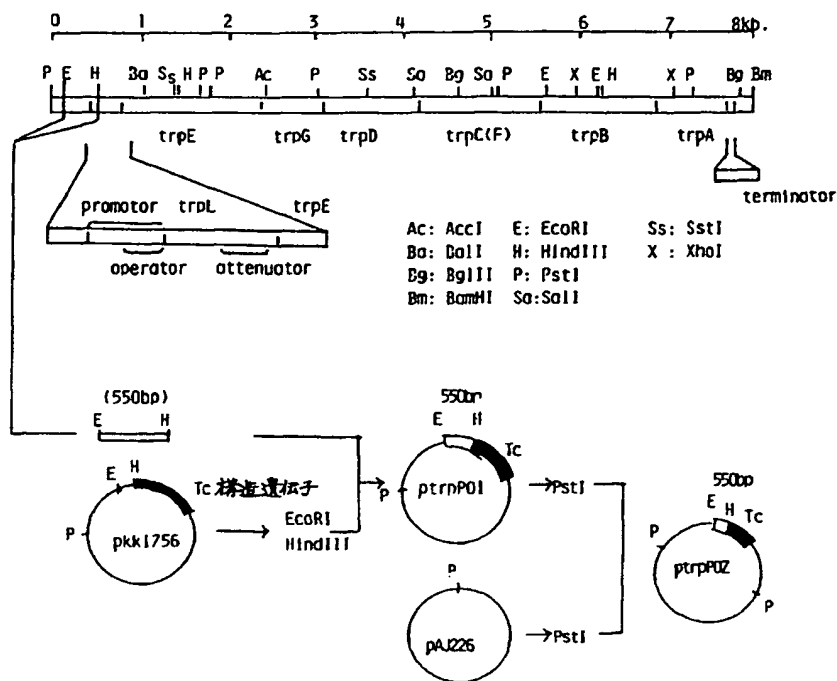
第2図



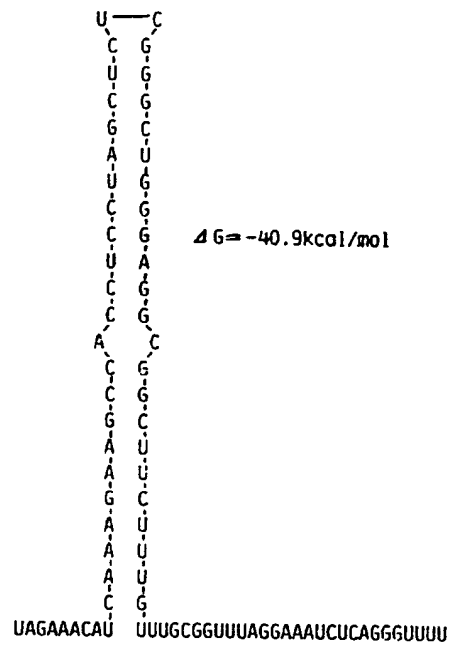
西
山
表

HaeIII
AGGAGGCGCGG TGGTGTGACT ATTACTCTGG CGATTATCA CAAGACTGCG CTGATATGCC CCAGCATTTGA
TCTCTCTGGCC ACCACACTGA TAATGGAGGC GCTAATAGTT GTTCTGAGCG GACTTACGGG GGTTCCTAAGT
-35 -10 HindIII
A1u1
GTGGGTAGAG CTGCGGAAAC TATCATAGAA CCGCAAAATG ATTATATAT GAGCAGAGCT T
GAACTACAGT CAGCATCTTC GAGCGCTTTG ATCTGTTCTT GGGTTTATAC TAAATATATA CTCTGTCTGA A

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 1

// C 12 P 21/02
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

6712-4B

手 校 補 正 出

昭和61年6月3日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第87600号

2. 発明の名称

トリアトファンオペロン、トリアトファンオペロンにコード
されるペプチド及び蛋白、トリアトファンオペロンの遺伝子
発現利用方法及びトリアトファンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌 山 勝 弘

4. 補正命令の日付

自死

5. 補正により増加する発明の数

なし

6. 補正の対象

明細書中の発明の詳細な説明の欄

および図面（第1図、第2図、第4図）

6. 4

2000

圖一

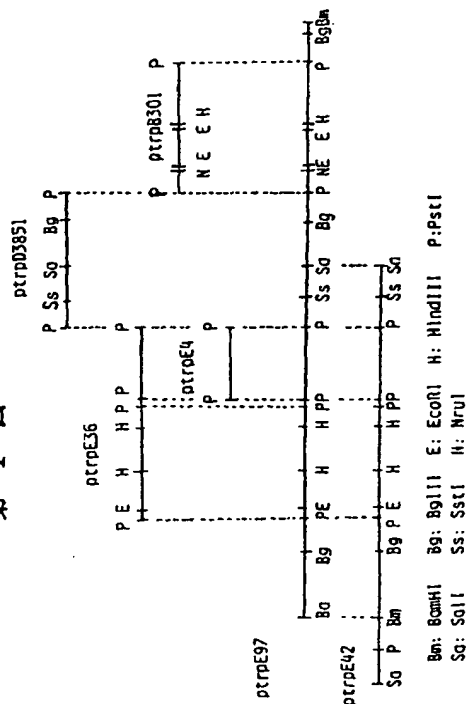
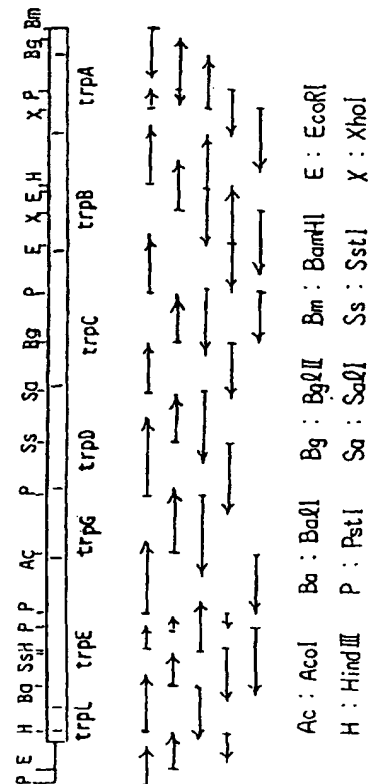


图 2 第



Ac : Acol Ba : BaolI Bg : Bg2II Bm : BamHI E : EcoRI
H : HindIII P : PstI Sa : SaolI Ss : SstI X : XhoI

第 4 図

